

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 850 864**

②① N° d'enregistrement national : **03 50023**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 7/06, A 61 K 7/02, 7/04

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 12.02.03.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 13.08.04 Bulletin 04/33.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : L'OREAL Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : MICHELET JEAN FRANCOIS et  
COMMO STEPHANE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : L'OREAL.

⑤④ UTILISATION D'UN INHIBITEUR DE 15-HYDROXY PROSTAGLANDINE DESHYDROGENASE POUR  
FAVORISER LA PIGMENTATION DE LA PEAU OU DES PHANERES.

⑤⑦ L'invention concerne l'utilisation d'au moins un inhibi-  
teur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase dans  
une composition ou pour la préparation d'une composition  
destinée à favoriser la pigmentation de la peau et/ou des  
phanères. Elle concerne également des compositions con-  
tenant un tel inhibiteur et un procédé cosmétique pour favo-  
riser la pigmentation de la peau, des poils et/ou des  
cheveux

FR 2 850 864 - A1



La présente invention se rapporte à un procédé cosmétique pour favoriser la pigmentation de la peau et/ou des phanères, en particulier des cheveux et/ou des poils et à l'utilisation d'inhibiteurs de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase dans des compositions destinées à lutter contre la canitie.

La couleur des cheveux et de la peau humaine est fonction de différents facteurs et notamment des saisons de l'année, de la race, du sexe et de l'âge. Elle est principalement déterminée par la concentration de mélanine produite par les mélanocytes. Les mélanocytes sont les cellules spécialisées qui par l'intermédiaire d'organelles particuliers, les mélanosomes, synthétisent la mélanine.

La synthèse de la mélanine ou mélanogénèse est complexe et fait intervenir schématiquement les principales étapes suivantes :

Tyrosine ---> Dopa ---> Dopachrome ---> Mélanine

La tyrosinase (monophénol dihydroxyl phénylalanine : oxygen oxydoreductase EC 1.14.18.1) intervient dans cette suite de réactions en catalysant notamment la réaction de transformation de la tyrosine en Dopa (dihydroxyphénylalanine) et la réaction de transformation de la Dopa en Dopachrome.

La partie supérieure du follicule pileux se présente comme une invagination tubulaire de l'épiderme qui s'enfonce jusqu'aux couches profondes du derme. La partie inférieure, ou bulbe pileux, comporte elle-même une invagination dans laquelle se trouve la papille dermique. On trouve, autour de la papille dermique, dans la partie inférieure du bulbe une zone peuplée de cellules à haut taux de prolifération (cellules de la matrice). Ces cellules sont les précurseurs des cellules kératinisées qui constitueront le cheveu. Les cellules qui résultent de la prolifération de ces précurseurs migrent verticalement dans le bulbe et se kératinisent progressivement dans la partie supérieure du bulbe, cet ensemble de cellules kératinisées formera la tige pileuse. La pigmentation du cheveu et des poils requiert la présence de mélanocytes au niveau du bulbe du follicule pileux. Ces mélanocytes sont dans un état actif, c'est-à-dire qu'ils synthétisent des mélanines. Ces pigments sont transmis aux kératinocytes destinés à former la tige pileuse ce qui conduira à la pousse d'un cheveu ou d'un poil pigmenté. Cette structure est appelée "unité folliculaire de pigmentation".

On sait que dans la plupart des populations la coloration brune de la peau et le maintien d'une coloration constante du cheveu sont des aspirations importantes.

Il est admis que l'apparition de poils et/ou de cheveux gris ou blancs, ou canitie, est associée à une diminution de mélanine dans la tige pileaire. Ce phénomène survient naturellement au cours de la vie d'un individu. Toutefois, l'être humain cherche à avoir un aspect plus jeune et dans un but esthétique, il est souvent tenté de lutter contre ce phénomène, surtout lorsqu'il se produit à un âge relativement précoce.

On a ainsi proposé de nombreuses solutions dans le domaine de la coloration artificielle par apport de colorants exogènes visant à donner aux cheveux une coloration la plus proche possible de ce qu'elle est naturellement. Une autre approche consiste à stimuler la voie naturelle de la pigmentation.

Parmi les solutions proposées, on peut citer des compositions contenant un inhibiteur de phosphodiésterases (WO9517161), des fragments d'ADN (WO9501773), du diacyl glycérol (WO9404122), des prostaglandines (WO9511003) ou des dérivés de pyrimidine 3-oxyde (EP829260).

Cependant il existe toujours un besoin de nouvelles solutions efficaces pour favoriser la pigmentation de la peau, des cheveux et/ou des poils et donc prévenir ou diminuer la canitie.

De manière inattendue, la demanderesse a maintenant trouvé qu'il était possible de stimuler la synthèse de mélanine par des mélanocytes en inhibant spécifiquement la dégradation des prostaglandines synthétisés par ces mélanocytes ou celles présentes dans son environnement.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase dans une composition ou pour la préparation d'une composition destinée à favoriser la pigmentation de la peau ou des phanères, en particulier des cheveux et/ou des poils.

On avait précédemment décrit l'implication de certaines prostaglandines dans la pigmentation chez l'homme ou chez l'animal, des poils ou de la peau. (Wand M., 1997, Arch. Ophtalmol, 115; Abdel Malek et al, 1987, cancer Res., 47)

Cependant, les prostaglandines sont des molécules au temps de demi-vie biologique très court et agissant de façon autocrine ou paracrine, ceci traduisant le caractère local

et labile du métabolisme des prostaglandines (Narumiya S et *al.*, 1999, *Physiol Rev*, **79**(4), 1193-1226).

De manière surprenante, la demanderesse a maintenant mis en évidence qu'une enzyme spécifiquement impliquée dans la dégradation de ces prostaglandines est exprimée dans les fibroblastes de la papille dermique du cheveu, qui est un compartiment déterminant pour la vie du cheveu. En effet, la demanderesse a maintenant prouvé l'expression de 15 hydroxy prostaglandine déshydrogénase (15-PGDH) à ce niveau.

De plus, il a été montré dans le cadre de l'invention, que cette enzyme est également exprimée dans le mélanocyte du cheveu, ce qui n'avait jamais été mis en évidence jusqu'à présent.

La 15-PGDH est une enzyme clé dans la désactivation des prostaglandines; la 15-PGDH de type 1 répond à la classification EC 1.1.1.141 et est NAD<sup>+</sup> dépendante. Cette enzyme catalyse une réaction d'oxydation sur le carbone 15 de l'hydroxyle en cétone. Elle a été isolée de rein de porc; on a notamment observé son inhibition par une hormone thyroïdienne, la tri-iodo thyronine, à des doses très supérieures aux doses physiologiques. La 15-PGDH de type 2 est NADP dépendante.

Cependant on n'avait jamais mis en évidence la présence de 15-PGDH dans la papille dermique et le mélanocyte du cheveu, et il n'avait jamais été proposé d'utiliser un inhibiteur de 15 PGDH pour favoriser la pigmentation de la peau, des poils et/ou des cheveux.

Conformément à l'invention, il est possible de réguler localement le taux de prostaglandines (dont le mode d'action est autocrine et paracrine) notamment celui présent au niveau du mélanocyte, en particulier du cheveu, en agissant sur la dégradation catalysée à la fois par la 15-PGDH du mélanocyte et du fibroblaste de la papille dermique.

La demanderesse a en outre montré de façon surprenante que les mélanocytes de cheveux expriment la prostaglandine H synthase 1 (PGHS-1 ou COX-1, E.C : 1.14.99.1). Ceci démontre pour la première fois que les mélanocytes de cheveux possèdent un métabolisme des prostaglandines autonome.

De manière inattendue, on a montré dans le cadre de la présente invention qu'il était possible d'inhiber spécifiquement la 15-PGDH présente au niveau de la papille dermique et/ou du mélanocyte de cheveu. Une telle inhibition permet donc de freiner la désactivation des prostaglandines dans l'environnement du mélanocyte de cheveu. Les prostaglandines peuvent donc continuer par voie autocrine ou paracrine de stimuler les mélanocytes. En effet, l'application de tels inhibiteurs stimule la production par les mélanocytes de mélanine.

Par phanères, on entend l'ensemble des annexes tégumentaires et notamment les ongles, les poils et les cheveux. Par poils et cheveux on entend l'ensemble des annexes pileuses et notamment également les cils et les sourcils.

Les compositions selon l'invention pourront être appliquées par toute voie appropriée, notamment orale, parentérale ou topique externe, et leur formulation sera adaptée par l'homme du métier, en particulier pour des compositions cosmétiques ou dermatologiques. Avantageusement, les compositions selon l'invention sont destinées à une administration par voie topique. Elles contiennent un milieu physiologiquement acceptable, en particulier un milieu cosmétologiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement acceptable.

Dans un mode de réalisation préféré, une composition selon l'invention contient des excipients adaptés à une administration sur le cuir chevelu.

Le milieu physiologiquement acceptable dans lequel on utilise les inhibiteurs de 15-PGDH selon l'invention peut être anhydre ou aqueux.

La composition peut comprendre un milieu cosmétologiquement acceptable pouvant être constitué d'eau ou d'un mélange d'eau et d'au moins un solvant choisi parmi les solvants organiques hydrophiles, les solvants organiques lipophiles, les solvants organiques amphiphiles et leurs mélanges.

On entend par milieu anhydre, un milieu solvant contenant moins de 1% d'eau. Ce milieu peut être constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants choisi plus particulièrement parmi les alcools inférieurs en C2-C4 comme l'alcool éthylique, les alkylèneglycols comme le propylèneglycol, et les alkyléthers d'alkylèneglycols ou de dialkylèneglycols, dont les radicaux alkyle ou alkylène contiennent de 1 à 4 atomes de carbone. On entend par milieu aqueux, un milieu constitué par de l'eau ou un mélange d'eau et d'un autre solvant physiologiquement acceptable, choisi notamment parmi les solvants organiques

cités ci-dessus. Dans ce dernier cas, ces autres solvants, lorsqu'ils sont présents, représentent environ 5 à 95% en poids de la composition.

Il est possible que le milieu physiologiquement acceptable puisse contenir d'autres adjuvants habituellement utilisés dans le domaine cosmétique ou pharmaceutique, tels que des agents tensioactifs, des agents épaississants ou gélifiants, des agents cosmétiques, des agents conservateurs, des agents alcalinisants ou acidifiants bien connus dans l'état de la technique, et en quantités suffisantes pour obtenir la forme de présentation désirée, notamment de lotion plus ou moins épaissie, de gel, d'émulsion, ou de crème. L'utilisation peut éventuellement se faire sous une forme pressurisée en aérosol ou vaporisée à partir d'un flacon pompe.

Pour une application topique, la composition utilisable selon l'invention peut être notamment sous la forme de solutions ou de suspensions aqueuse, alcoolique, hydroalcoolique ou huileuse, ou de dispersion du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide ou pâteuses, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H) ou multiples, , d'une poudre libre ou compactée à utiliser telle quelle ou à incorporer dans un milieu physiologiquement acceptable, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique. Elle peut ainsi se présenter sous forme d'onguent, de teinture, de laits, de crème, de pommade, de poudre, de timbre, de tampon imbibé, de solution, d'émulsion ou de dispersion vésiculaire, de lotion, de gels aqueux ou anhydres, de spray, de suspension, de shampooing, d'aérosol ou de mousse. Elle peut être anhydre ou aqueuse. Elle peut également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage.

Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

La composition utilisable selon l'invention peut en particulier consister en une composition pour soins capillaires, et notamment un shampooing, une lotion de mise en plis, une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, des lotions restructurantes pour les cheveux, un masque, etc.

La composition cosmétique selon l'invention sera préférentiellement une crème, une lotion capillaire, un shampooing ou un après-shampooing. Elle peut être utilisée notamment dans les traitements mettant en oeuvre une application qui est suivie ou non suivie d'un rinçage, ou encore sous forme de shampooing.

Elle peut également se présenter sous forme de teinture ou de mascara à appliquer au pinceau ou au peigne, en particulier sur les cils, les sourcils ou les cheveux.

Elle peut également se présenter sous forme de vernis destiné à être appliqué à la

surface de l'ongle.

Les quantités des différents constituants des compositions utilisables selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5% à 80% en poids, et de préférence de 5% à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsionnants et les co-émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3% à 30% en poids, et de préférence de 0,5 à 20% en poids par rapport au poids total de la composition. L'émulsion peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une solution ou un gel huileux, la phase grasse peut représenter plus de 90% du poids total de la composition.

Avantageusement, la composition comprendra des microsphères, des nanosphères, des liposomes, des oléosomes ou des nanocapsules, dans lesquels au moins un agent inhibiteur de la 15-PGDH sera encapsulé. Des exemples de telles formulations sont décrits notamment dans les brevets EP199636, EP 375520, EP447318, EP557489, WO 97/12602, EP1151741 ou US 5 914126.

A titre d'exemple, les microsphères pourront être préparées selon la méthode décrite dans la demande de brevet EP 0 375 520.

Les nanosphères pourront se présenter sous forme de suspension aqueuse et être préparées selon les méthodes décrites dans les demandes de brevet FR 0015686 et FR 0101438.

Les oléosomes consistent en une émulsion huile dans eau formée par des globules huileux pourvus d'un enrobage cristal liquide lamellaire dispersé dans une phase aqueuse (voir les demandes de brevet EP 0 641 557 et EP 0 705 593).

L'inhibiteur de 15PGDH pourra aussi être encapsulé dans des nanocapsules consistant en un enrobage lamellaire obtenu à partir d'un tensio-actif siliconé tel que décrit dans la demande de brevet EP 0 780 115; les nanocapsules pourront également être préparées

à base de polyesters sulfonique hydrodispersibles selon par exemple la technique décrite dans la demande de brevet FR 0113337.

De façon connue, la composition selon l'invention peut contenir également des adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les additifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique, et par exemple de 0,01% à 20%, notamment inférieur ou égal à 10% du poids total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans les sphérules lipidiques.

Comme huiles ou cires utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles végétales (fraction liquide du beurre de karité, huile de tournesol), les huiles animales (perhydrosqualène), les huiles de synthèse (huile de Purcellin), les huiles ou cires siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers), les cires d'abeille, de carnauba ou paraffine. On peut ajouter à ces huiles des alcools gras et des acides gras (acide stéarique).

Comme émulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple le stéarate de glycérol, ou laurate de glycérol, les stéarates ou oléates de sorbitol, les alkyl diméthiconecopolyol (avec  $\text{alkyle} \geq 8$ ) et leurs mélanges pour une émulsion E/H. On peut aussi utiliser le monostéarate ou monolaurate de polyéthylène glycol, le stéarate ou oléate de sorbitol polyoxyéthyléné, les diméthiconecopolyols et leurs mélanges, notamment le polysorbate 60 et le mélange de PEG-6/PEG-32/Glycol Stéarate vendu sous la dénomination de Tefose® 63 par la société Gattefosse.

Comme solvants utilisables dans l'invention, on peut citer les alcools inférieurs, notamment l'éthanol et l'isopropanol, le propylène glycol.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables dans l'invention, on peut citer les polymères carboxyviniliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides tels que l'hydroxypropylcellulose, les gommes naturelles et les argiles, et, comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les Bentones®, les sels métalliques d'acides gras comme les stéarates d'aluminium et la silice hydrophobe, l'éthylcellulose.

Lorsque la composition est épaissie ou gélifiée à l'aide d'un agent épaississant, ce dernier est généralement présent dans des concentrations comprises entre environ 0,1 et



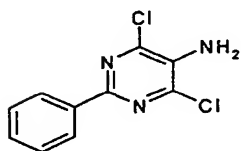
6% par rapport au poids total de la composition.

De préférence, le ou les agents inhibiteurs sont présents à une concentration de 0,001% à 5% p/v par rapport à la composition, de manière encore préférée de 0,01 à 2%. Toutefois ces quantités seront adaptées par l'homme du métier selon le composé utilisé, pour obtenir une activité d'inhibition enzymatique équivalente à une inhibition pratiquement totale de l'enzyme 15-PGDH.

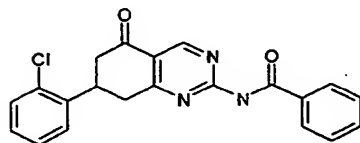
Des inhibiteurs de la 15-PGDH adaptés pourront être déterminés par l'homme du métier; l'agent inhibiteur sera notamment choisi parmi le traxanox, ses sels et ses esters, le nafazatom, les sulfasalazines, le PhCL28A, ou les thiazolidinediones telles que décrites par Cho et al (Arch. Biochem. Biophys., 2002; **405**, 247-251).

D'autres composés particulièrement adaptés à la mise en œuvre de l'invention sont les composés répondant aux formules suivantes :

Molécule A:



Molécule B:



Selon un mode de réalisation préféré, les compositions selon l'invention comprennent en outre au moins un agent bénéfique pour les cheveux tels que notamment les silicones, les huiles végétales, animales, minérales ou de synthèse, les cires, les céramides, les pseudocéramides, les polymères cationiques, les filtres solaires, les vitamines.

Les silicones utilisables conformément à l'invention sont en particulier des polyorganosiloxanes insolubles dans la composition et peuvent se présenter sous forme d'huiles, de cires, de résines ou de gommes.

Les organopolysiloxanes sont définis plus en détail dans l'ouvrage de Walter NOLL "Chemistry and Technology of Silicones" (1968) Academie Press. Elles peuvent être volatiles ou non volatiles.

Selon un de ses aspects, l'invention a pour objet l'utilisation non thérapeutique d'une composition cosmétique contenant au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase pour le traitement de la canitie. L'utilisation d'une telle composition selon l'invention sera en particulier destinée à prévenir ou limiter l'apparition de poils ou de cheveux blancs, ou à en réduire le nombre.

Selon un mode de réalisation préféré, la composition utilisable selon l'invention contient en outre au moins un agent accélérateur de pénétration.

De tels agents sont connus de l'homme du métier et comprennent notamment l'urée ou les composés cités dans la demande WO 01/74313. Ils seront classiquement présents à des concentrations de 0,01 à 20%, et notamment de 0,1 à 5%.

Avantageusement, les compositions utilisables selon l'invention contiennent en outre au moins un agent favorisant la pigmentation de la peau, des cheveux et/ou des poils différent d'un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase.

De tels composés sont notamment des substrats de la tyrosinase, tels que la tyrosine ou la L-DOPA, ou des composés activateurs de la voie de l'AMPc tels que des dérivés de pro-opiomélanocortines, l'adénosine, ou la forskoline ou ses dérivés. On peut également citer des extraits de végétaux tels que cyprès, Burnet, Sanguisorba officinalis ou de chrysanthème (*Chrysanthemum morifolium*), décrit notamment dans EP1014934.

Les compositions comprenant au moins un inhibiteur de 15-PGDH selon l'invention pourront également contenir des systèmes catalytiques comprenant 2 constituants, à savoir un premier constituant choisi parmi les sels et oxydes de Mn(II) et/ou Zn(II) et leurs mélanges et un second constituant choisi parmi les hydrogénocarbonates alcalins, les hydrogénocarbonates alcalino-terreux et leurs mélanges. De telles compositions favorisant la pigmentation sont notamment décrites dans les demandes FR 2 814947, FR 2 814943, FR 2 814946 ou FR 2 817469.

Selon une variante préférée, l'agent inhibiteur de 15 PGDH sera utilisé en association avec un composé actif pour favoriser la pigmentation des cheveux désavantageusement susceptible d'être métabolisé par cette enzyme. En effet, grâce aux travaux de la demanderesse, on sait maintenant que certains composés classiquement proposés à cet effet ont une activité moindre en raison de la présence de 15PGDH, qui par son action diminue la concentration et donc l'efficacité des substances au niveau du site d'action.

Conformément à la présente invention, on peut désormais obtenir des compositions ayant une efficacité renforcée, en associant un composé actif pour favoriser la pigmentation des cheveux, susceptible d'être métabolisé par la 15PGDH et un inhibiteur de la 15PGDH tel que défini précédemment. On obtiendra ainsi une action synergique des actifs pour favoriser la pigmentation des cheveux dans ces compositions.

La composition contiendra par exemple en outre au moins un composé choisi parmi les prostaglandines, notamment la prostaglandine PGE1, PGE2, leurs sels, leurs esters, leurs analogues et leurs dérivés, notamment ceux décrits dans WO 98/33497, WO 95/11003, JP 97-100091, JP 96134242, en particulier les agonistes des récepteurs des prostaglandines. Elle peut notamment contenir au moins un composé tel les agonistes (sous forme acide ou sous forme d'un précurseur notamment sous forme ester) du récepteur de la prostaglandine F2 alpha (FP-R) à l'exemple du latanoprost, du fluprostenol, du cloprostenol, du travoprost, le bimatoprost, les agonistes (et leurs précurseurs notamment les esters) des récepteurs de la prostaglandine E2 (EP1-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R) tel le 17 phényle PGE2, le viprostol, le butaprost, le misoprostol, le sulprostone, le 16,16 diméthyle PGE2, 11 désoxy-PGE1, le 1 désoxy PGE1, les agonistes et leurs précurseurs notamment les esters du récepteur de la prostacycline (IP) tel le cicaprost, l'iloprost, l'isopcarbacycline, le beraprost, les agonistes et leurs précurseurs notamment les esters du récepteur de la prostaglandine D2 tel le BW245C ((4S)-(3-[(3R,S)-3-cyclohexyl-3-isopropyl]-2,5-dioxo)4-imidazolidineheptanoic acid), le BW246C ((4R)-(3-[(3R,S)-3-cyclohexyl-3-isopropyl]-2,5-dioxo)4-imidazolidineheptanoic acid) les agonistes et leurs précurseurs notamment les esters du récepteur aux thromboxanes A2 (TP) tel le l-BOP ([1S-[1a,2a(Z), 3b(1E,3S),4a]]-7-[3-[3-hydroxy-4-[4-(iodophenoxy)-1-butenyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid

Avantageusement, la composition selon l'invention comprendra au moins un inhibiteur de la 15PGDH tel que défini précédemment et au moins une prostaglandine ou un dérivé de prostaglandine comme par exemple les prostaglandines de la série 2 dont notamment PGF 2  $\alpha$  et PGE 2 sous forme salines ou sous forme de précurseurs notamment des esters (exemple les isopropyl esters), leurs dérivés comme le 16,16

diméthyl PGE2, le 17 phényl PGE2, le 16,16 diméthyle PGF2 $\alpha$ , le 17 phényl PGF2 $\alpha$  les prostaglandines de la série 1 comme le 11 désoxy prostaglandine E1 , le 1 désoxy prostaglandine E1 sous forme salines ou sous forme de précurseurs notamment des esters, ou un agoniste non prostanoïque des récepteurs EP2 et/ou EP4 notamment tel que décrit dans EP 1175892.

De préférence, l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est peu ou pas inhibiteur des enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines au niveau du cheveu, ou prostaglandine synthases (notamment de la PGHS-1 ou COX-1, de la prostaglandine endoperoxyde H synthase, ou de la PGFsynthase).

D'autres actifs bénéfiques pour la santé et la vigueur des cheveux ou des poils pourront être présents dans la composition.

On peut notamment citer d'autres composés actifs pour favoriser la repousse et/ou limiter la chute des cheveux.

Ces composés pourront notamment être choisis parmi les inhibiteurs de lipoxgénase tels que décrits dans EP648488, les inhibiteurs de bradykinine décrits notamment dans EP 845700, les prostaglandines et leurs dérivés tels que décrits dans ce qui précède, les analogues non prostanoïques de prostaglandines tels que décrits dans EP 1175891 et EP1175890, WO 01/74307, WO 01/74313, WO 01/74314, WO 01/74315 ou WO 01/72268.

Des agents favorisant la pousse du cheveux pouvant être présents dans les compositions selon l'invention incluent les vasodilatateurs, les antiandrogènes, les cyclosporines et leurs analogues, les anti-microbiens, , les rétinoïdes, les tri-terpènes, seuls ou en mélange.

Les vasodilatateurs tels que les agonistes des canaux potassium incluant le minoxidil et les composés cités dans les brevets US 3 382247, 5 756092, 5 772990, 5 760043, 5466694, 5 438058, 4 973474, la chromakaline, le nicorandil et le diaxozide peuvent ainsi être présents dans les compositions.

Les anti-androgènes utilisables incluent notamment les inhibiteurs de 5 $\alpha$  réductase, comme le finastéride et les composés décrits dans US 5 516779, l'acétate de cyprostérone, l'acide azélaïque, ses sels et ses dérivés et les composés décrits dans US 5 480913, le flutamide et les composés décrits dans les brevets US 5 411981, 5 565467 et 4 910226.

Les composés anti-microbiens peuvent être choisis parmi les dérivés du sélénium, le kétoconazole, le triclocarban, le triclosan, le pyrithione zinc, l'itraconazole, l'acide

asiatique, l'hinokitiol, mipirocine, et les composés décrits dans EP680745, le chlorhydrate de clincine, le peroxyde de benzoyle ou de benzyl et la minocycline.

Les rétinoïdes pourront être choisis parmi l'isotrétinoïne, l'acitrétine et le tazarotène.

D'autres composés actifs pour favoriser la pousse et/ou limiter la chute des cheveux présents dans les compositions pourront également être choisis dans le groupe comprenant l'aminexil et ses dérivés, le 6-O-[(9Z,12Z)-octadéca-9,12-diénoyl]hexapyranose, chlorure de benzakonium, chlorure de benzethonium, phénol, oestradiol, maléate de chlorphéniramine, les dérivés de chlorophylline, cholestérol, cystéine, méthionine, nicotinate de benzyle, menthol, huile de menthe poivrée, panthoténate de calcium, panthénol, résorcinol, les activateurs de la protéine kinase C, les inhibiteurs de la glycosidase, les inhibiteurs de glycosaminoglycanase, les esters d'acide pyroglutamique, les acides hexosaccharidiques ou acyl-hexosaccharique, éthylènes aryl substitués, les amino acides N-acylés, les flavonoïdes, les dérivés et analogues d'ascomycine, les antagonistes d'histamine, les triterpènes comme l'acide ursolique et les composés décrits dans US 5529769, US 5468888, US 5631282, les saponines, les inhibiteurs de protéoglycanase, les agonistes et antagonistes d'estrogènes, pseudotriènes, les cytokines et les promoteurs de facteurs de croissance, les inhibiteurs d'IL-1 ou d'IL-6, les promoteurs d'IL-10, les inhibiteurs de TNF, les vitamines, comme la vitamine D, les analogues de la vitamine B12 et le panthoténol, les hydroxyacides, benzophénones et l'hydantoïne.

L'invention a également pour aspect un procédé cosmétique pour favoriser la pigmentation de la peau, des ongles, des poils et/ou des cheveux, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau et/ou le cuir chevelu et/ou les phanères au moins un inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase, ou une composition telle que définie précédemment. La composition ou l'inhibiteur de 15-PGDH seront appliqués au site d'action et seront laissés en contact pendant un temps plus ou moins long, l'application pouvant être répétée à intervalles réguliers ou non pendant plusieurs heures, jours, semaines ou mois.

L'inhibiteur de 15PGDH pourra être appliqué simultanément avec les autres actifs proposés en association ou de façon séquentielle dans le temps.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans en limiter la portée. Dans ces exemples on se référera aux figures suivantes.

Figure 1: expression de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase par des mélanocytes de cheveux en culture.

Figure 2: expression de prostaglandine H synthase 1 par des mélanocytes de cheveux en culture.

**Exemple 1:** Mise en évidence de l'expression de l'ARNm codant pour la PGHS-1 (témoin ARNm codant pour la Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase) et codant pour la 15-PGDH (témoin ARNm pour l'actine) dans les mélanocytes de cheveux pigmentés.

**a- Isolement des mélanocytes de cheveux pigmentés :**

La biopsie de scalp humain est découpée en petits morceaux, placés dans une solution de dispase (2,4 U/ml, Boehringer Mannheim, GmbH, D) et incubés dix huit heures à +04°C. Les fragments sont ensuite lavés dans du PBS. Le compartiment épithélial est séparé du derme à l'aide de pinces sous binoculaire. Les structures épithéliales sont ensuite micro-disséquées pour séparer les follicules pileux et l'épiderme, puis triées. Les cheveux isolés sont regroupés et traités par la trypsine cinq minutes à 37°C, puis la trypsine est neutralisée (Trypsin Neutralising System (TNS), C41110, Promocell, Heidelberg, D). La suspension cellulaire obtenue estensemencée dans le milieu pour culture primaire pour mélanocytes (M2, Promocell, Heidelberg, D). Après six jours de culture, le milieu est renouvelé tous les deux ou trois jours. Après dix à vingt jours la culture est constituée de kératinocytes et de mélanocytes. Les mélanocytes sont sélectionnés par trypsination différentielle en incubant la culture avec de la trypsine-EDTA 0,05%-0,02% (w/v) pendant trois minutes à 37°C, puis la trypsine est neutralisée par le TNS. Il peut arriver que la culture primaire contienne quelque fibroblastes contaminants, ces derniers sont éliminés par un traitement répété à la généticine 25 µg/ml.

**b- Extraction et purification des ARN messagers :**

L'extraction des ARN messagers est réalisée à partir de deux cultures de mélanocytes de follicules pileux distinctes, originaires de deux prélèvements issus d'individus différents. L'extraction des ARN messagers (réalisée sur les passages P3 ou P4, boîte de 35 mm à confluence) est effectuée selon le protocole et avec les réactifs du kit QuickPrepr mRNA (Pharmacia Biotech, Bruxelles, Belgique).

Pour chaque échantillon (une culture cellulaire à confluence dans une boîte de 35 mm de diamètre) mis à l'étude, le protocole suivant sera appliqué.

Le surnageant de culture cellulaire est éliminé et remplacé par 800 µl de tampon de lyse, le lysat obtenu est récupéré et introduit dans un microtube en polypropylène de 1,5 ml (tube 1).

1 ml de suspension de microsphères Oligo(dT-18) cellulose est introduit dans un microtube de 1,5 ml (tube 2) et centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé. Le contenu du tube 1 est alors introduit dans le tube 2, les microsphères sont remise en suspension dans le lysat par agitation douce du tube pendant 3 minutes.

Les ARNs polyA<sup>+</sup> fixés sur les microsphères sont isolés des contaminants par des lavages. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est éliminé et remplacé par 1 ml de tampon de lavage (high salt buffer). Les microsphères sont remises en suspension comme précédemment et le tube est agité doucement pendant 1 minute. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est à nouveau éliminé et remplacé par 1ml de low salt buffer.

Au total cinq lavages avec le low salt buffer suivis de trois lavages avec le high salt buffer seront ainsi effectués.

Le contenu du troisième lavage (microsphères + tampon) est introduit sur une microcolonne contenant un filtre à la base (colonne microspin<sup>TM</sup>) placée dans un microtube de 1,5 ml. L'ensemble est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. La microcolonne est récupérée et placée dans un microtube de 1,5 ml. Les ARN messagers polyA<sup>+</sup> sont alors élués par un volume final total de 0,4 ml de tampon d'éluion préalablement porté à 65°C.

#### c- Synthèse des brins complémentaires d'ADN (ADNc) :

Cette étape est réalisée par l'utilisation du kit First strand cDNA synthesis (Pharmacia Biotech, Bruxelles, Belgique).

Les échantillons d'ADN complémentaires obtenus sont dilués au 1/10 ème dans de l'eau stérile avant PCR.

#### d- Choix des amorces, PCR (Poly Chain Reaction)

Des amorces spécifiques des séquences d'intérêts seront utilisées après synthèse à façon par Genset SA, rue Robert et Sonia Delaunay, Paris.

Le premier couples d'amorces s'hybridant sur la séquence codant pour une protéine ubiquitaire (la glyceraldéhyde 3 phosphodéshydrogénase). Les deux autres couples

d'amorces s'hybridant sur la séquence codant pour la prostaglandine H synthase 1 et la 15 hydroxyprostaglandine déshydrogénase respectivement.

**$\beta$  Actine humaine; N° accession genbank: NM\_001101**

AMORCE SENS: 5'-ATGGATGATGATATCGCCGCGCT-3'

Amorce anti-sens: 5'-CGGACTCGTCATACTCCTGCTTG-3'

Fragment amplifié: 1096 paires de bases.

**Prostaglandine H synthase 1 (PGHS-1) ; N° accession genbank : S36271**

Amorce sens: 5'-CTCATAGGGGAGACCATCAAG-3'

Amorce anti-sens: 5'-CCTTCTCTCCTACGAGCTCCT-3'

Fragment amplifié: 451 paires de bases.

**15 hydroxyprostaglandine humaine (15PGDH); N° accession genbank: NM\_000860**

Amorce sens: 5'-TGCCAATGGATTGATAACACTCAT-3'

Amorce anti-sens: 5'-ACAGCAGTTTTTCATCTGGGATATG-3'

Fragment amplifié: 706 paires de bases.

Les réactions PCR sont réalisées selon le protocole TAKARA Taq™, TAKARA Shuzo Co., LTD. Biomedical Group, Seta 3-4-1, Otsu, Shiga, 520-2193, Japon. Les températures d'hybridation (THs) sont respectivement de 54°C (15-PGDH) et 57°C (Actine, GAPDH et PGHS-1) le nombre de cycles =35.

1  $\mu$ l de chacun des échantillons d'ADN complémentaires est en réaction.

5  $\mu$ l (2,5  $\mu$ l + 2,5  $\mu$ l) des couples d'amorces à 40 ng/ $\mu$ l sont en réaction.

4' à 95°C	1 cycle
30" à 94°C	
1' à THs°C	35 cycles
1' à 72°C	
7' à 72°C	1 cycle

#### d- Lecture

##### 1.1 Préparation d'un gel d'agarose.



Pesée de 0,65 g d'agar (Molecular biology certified agarose, Bio-Rad laboratories 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547, USA).

Ajout de 50 ml de tampon 1X TAE, Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

L'agarose en suspension est portée à ébullition puis introduite dans une cuve contenant une goutte de bromure d'éthidium (25 µg), Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

Un "peigne" permettant le dépôt des échantillons est placé à une extrémité de la cuve.

Après 30 minutes de refroidissement (température de la pièce), 20 µl des résultats de PCRs sont introduits individuellement dans un puits du gel, de même que 10 µl d'un standard échelle de poids moléculaires (Amplisize™, molecular Ruler, 170-8200), Bio-Rad.

L'ensemble est soumis en immersion dans un large excès de tampon TAE 1X à un champ électrique de 100 volts pendant 45 minutes.

L'exposition du gel sous un éclairage ultra-violet permet d'observer par fluorescence, les résultats obtenus.

Les résultats de l'étude de l'expression de la 15PGDH sont montrés sur la figure 1

- A. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 1
- B. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 2
- M. Echelle de marqueurs moléculaires en paires de bases (pb)

A1, B1: expression de la 15-PGDH (706 pb)

A2, B2: expression de l'actine (gène de référence), (1096 pb)

Les gels montrant l'expression de la PGHS-1 sont représentés sur la figure 2:

- A. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 1
- B. source de cDNA issue de mélanocytes de cheveux donneur 2
- M. Echelle de marqueurs moléculaires en paires de bases (pb)

A1, B1: expression de la PGHS-1 (451 pb)

A2, B2: expression de l'actine (gène de référence), (1096 pb).

**Exemple 2:** Mise en évidence de l'expression de l'ARNm de la 15PGDH dans les fibroblastes de papilles dermiques de cheveux en culture.

#### 1. Dissection des follicules pileux.

Des follicules pileux provenant de lifting de donneurs volontaires sont disséqués selon la méthode décrite dans le brevet B.Bernard/O.Gaillard FR2736721A1 du 17/01/97; US5712169A du 28/01/98.

Les follicules isolés sont placés en immersion dans une boîte de pétri contenant 20 ml de milieu de culture 199 Gibco référence 31153-018, Life technologie, BP 96, Cergy Pontoise Cedex, supplémenté à 1% (v/v) d'une solution d'antibiotiques Gibco référence 15240-096.

A l'aide de deux aiguilles, référence NN-2516R, Terumo europe N.V. Leuven, Belgique montées chacune sur une seringue de 1ml, référence BS-01N, Terumo, 15 papilles dermiques sont extraites des bulbes folliculaires.

Ces 15 papilles sont introduites dans une boîte de pétri de 35 mm de diamètre contenant 2 ml de milieu 199 précédemment utilisé contenant 20 % de sérum de veau foetal Gibco, référence 10091-130. La boîte est ensuite placée dans un incubateur thermostaté à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Un premier passage est réalisé après 3 semaines d'incubation sans que le milieu n'ait été préalablement remplacé. Le milieu est éliminé, 1 ml de solution de trypsine Gibco référence 25050-022 est introduit dans la boîte de pétri, la boîte est replacée dans l'incubateur 4 minutes. Les cellules (fibroblastes de papilles) ainsi remises en suspension dans la solution de trypsine (contrôle microscopique) sont introduites dans un tube de 15 ml, référence Falcon, 352097, Becton Dickinson, Chemin des sources, BP 37, Meylan 38241, contenant 10 ml de milieu 199 précédemment utilisé (contenant 20% de sérum de veau foetal).

Après centrifugation 5 min à 1500 tours par minute, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire repris par 5 ml de milieu 199 précédemment utilisé (contenant ici 10% de sérum de veau foetal).

La suspension cellulaire est introduite dans une boîte de pétri de 35 mm de diamètre et replacée dans l'incubateur (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

Les passages suivant P2,P3,P4 sont réalisés selon le même principe. Ceux-ci sont effectués dès lors que les cellules ont atteint la confluence.

## 2. Extraction et purification des ARN messagers.

L'extraction des ARN messagers des fibroblastes de papilles dermiques (réalisée sur les passages P3 ou P4, boîte de 35 mm à confluence) est effectuée selon le protocole et avec les réactifs du kit QuickPrepr mRNA (Pharmacia Biotech, Bruxelles, Belgique).

Pour chaque échantillon (une culture cellulaire à confluence dans une boîte de 35 mm de diamètre) mis à l'étude, le protocole suivant sera appliqué.

Le surnageant de culture cellulaire est éliminé et remplacé par 800 µl de tampon de lyse, le lysat obtenu est récupéré et introduit dans un microtube en polypropylène de 1,5 ml (tube 1).

1 ml de suspension de microsphères Oligo(dT-18) cellulose est introduit dans un microtube de 1,5 ml (tube 2) et centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé. Le contenu du tube 1 est alors introduit dans le tube 2, les microsphères sont remise en suspension dans le lysat par agitation douce du tube pendant 3 minutes.

Les ARNs polyA+ fixés sur les microsphères sont isolés des contaminants par des lavages. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est éliminé et remplacé par 1 ml de tampon de lavage (high salt buffer). Les microsphères sont remises en suspension comme précédemment et le tube est agité doucement pendant 1 minute. Le tube est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute, le surnageant est à nouveau éliminé et remplacé par 1ml de low salt buffer.

Au total cinq lavages avec le low salt buffer suivis de trois lavages avec le high salt buffer seront ainsi effectués.

Le contenu du troisième lavage (microsphères + tampon) est introduit sur une microcolonne contenant un filtre à la base (colonne microspin™) placée dans un microtube de 1,5 ml. L'ensemble est centrifugé à 14000 trs/min pendant 1 minute. La microcolonne est récupérée et placée dans un microtube de 1,5 ml. Les ARN messagers polyA+ sont alors élués par un volume final total de 0,4 ml de tampon d'éluion préalablement porté à 65°C.

### 3. Précipitation des ARN messagers.

Dans le tube contenant l'éluat sont introduits 10 µl de solution de glycogène, 40 µl d'acétate de potassium 2,5M et 1 ml d'éthanol absolu à -20°C. Le tube est placé dans de la carboglace (-80°C). Après 1h00, le tube est centrifugé à 4°C à 17500 trs/min pendant 15 minutes. Le surnageant est précautionneusement éliminé (les ARNms forment un tout petit culot) et remplacé par 1ml d'éthanol 80% (éthanol/eau ; v/v) à -20°C. Le tube est centrifugé 15 min à 17500 trs/min à 4°C et le surnageant complètement éliminé. Le culot est repris par 8 µl d'eau distillée stérile.

#### 4. Synthèse des brins complémentaires d'ADN (ADNc)

Cette étape est réalisée par l'utilisation du kit First strand cDNA synthesis (Pharmacia Biotech, Bruxelles, Belgique).

Le tube contenant les ARNms sont placés à 65°C pendant 10 minutes puis dans la glace pendant 5 minutes, sont ensuite introduits :

5 µl d'une solution tamponnée contenant une suspension de transcriptase inverse.

1 µl d'amorces OligodT(18) à 0,8 µg/ml.

1 µl de solution aqueuse de dithiothréitol titrant 200 nM.

Le tube est incubé à 37°C pendant 1h00. La réaction est bloquée en plaçant le tube dans la glace.

#### 5. Choix des amorces, réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1 µl (d'une dilution au 1/10 ème dans de l'eau distillée stérile) d'ADNs complémentaires ainsi obtenus est soumis dans un milieu tamponné à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), en présence de couples d'amorces spécifiques (titrant 40 ng/ml), de TAQ Polymérase et de nucléotides selon les données du fournisseur.

Les amorces spécifiques des séquences d'intérêts qui seront utilisées sont obtenues par synthèse à façon par Genset SA, rue Robert et Sonia Delaunay, Paris.

Le premier couples d'amorces s'hybridant sur la séquence codant pour une protéine ubiquitaire (la  $\beta$ actine). Le deuxième couple d'amorces s'hybridant sur la séquence codant pour la 15 hydroxyprostaglandine déshydrogénase.

**$\beta$  Actine humaine; N° accession genbank: NM\_001101**

**AMORCE SENS: 5'-ATGGATGATGATATCGCCGCGCT-3'**

**Amorce anti-sens: 5'-CGGACTCGTCATACTCCTGCTTG-3'**

Fragment amplifié: 1096 paires de bases.

**15 hydroxyprostaglandine humaine (15PGDH); N°accession genbank: NM\_000860**

**Amorce sens: 5'-TGCCAATGGATTGATAACACTCAT-3'**

**Amorce anti-sens: 5'-ACAGCAGTTTTTCATCTGGGATATG-3'**

Fragment amplifié: 706 paires de bases.

La réaction PCR est réalisée selon une adaptation du protocole TAKARA Taq™, TAKARA Shuzo Co., LTD. Biomedical Group, Seta 3-4-1, Otsu, Shiga, 520-2193, Japon. La température d'hybridation est de 54°C pour les couples d'amorces ( $\beta$ -actine ; PGFS, 15PGDH), le nombre de cycles =35.

\*Une solution tamponnée de nucléotides est réalisée par mélange de 171  $\mu$ l d'eau distillée stérile, 24,5  $\mu$ l de tampon 10X du kit et 20  $\mu$ l de mélange de nucléotides (dNTP) du kit.

Sont introduits dans un microtube adapté à la PCR :

1  $\mu$ l (d'une dilution au 1/10) d'ADN complémentaire  
 43  $\mu$ l du mélange de nucléotides en solution tamponnée \*  
 5  $\mu$ l (2,5  $\mu$ l + 2,5  $\mu$ l) des couples d'amorces à 40 ng/ $\mu$ l sont en réaction.  
 50  $\mu$ l d'huile minérale.

Le tube est placé dans un appareil pour PCR et les cycles suivants sont programmés.

4' à 95°C	1 cycle
30" à 94°C	
1' à 54°C	35 cycles
1' à 72°C	
7' à 72°C	1 cycle

## 6. Lecture

### a. Préparation d'un gel d'agarose.

Pesée de 0,65 g d'agar (Molecular biology certified agarose, Bio-Rad laboratories 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547, USA).

Ajout de 50 ml de tampon 1X TAE, Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

L'agarose en suspension est porté à ébullition puis introduit dans une cuve contenant une goutte de bromure d'éthidium (25  $\mu$ g), Amresco, Solon, OHIO 44139, USA.

Un "peigne" permettant le dépôt des échantillons est placé à une extrémité de la cuve.

Après 30 minutes de refroidissement (température de la pièce), 20 µl des résultats de PCRs sont introduits individuellement dans un puits du gel, de même que 10 µl d'un mélange de standards de poids moléculaires (Amplisize™, molecular Ruler, 170-8200, Bio-Rad laboratories 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547, USA)..

L'ensemble est soumis en immersion dans un large excès de tampon TAE 1X à un champ électrique de 100 volts pendant 45 minutes.

L'exposition du gel sous un éclairage ultra-violet permet d'observer par fluorescence, les résultats obtenus.

Poids des amplimères attendus.

Actine = 1096 paires de bases ; 15-PGDH = 706 paires de bases ; PGFS = 1061 paires de bases.

Les échantillons 1,2,3 proviennent de cultures différentes de fibroblastes de papilles dermiques de cheveux humains.

#### Recherche de l'expression de la 15 hydroxyprostaglandine déshydrogénase.

On constate que la 15-PGDH est exprimée dans les différents échantillons, avec une bande de PM caractéristique à 706 pb

### **Exemple 3**

#### Clonage à partir de fibroblastes de papilles dermiques

Ont été réalisées, à partir de culture de fibroblastes de papilles dermiques de cheveux tel que décrit dans l'exemple 1 l'extraction, la purification des ARN messagers poly-A+ puis la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc).

Des couples d'amorces (synthétisé par Genset) auxquels ont été ajoutés des séquences codant pour des sites de restrictions ont été choisis pour la 15-PGDH (n° d'accèsion Genbank = NM\_000860)

##### a) Amorces pour la 15-PGDH

5'-GGG GAT CCA TGC ACG TGA ACG GCA AAG TG-3' ; Amorce sens site BamH1 (en gras)

5'-TCT CGA GAG CTG TTC ATT GGG T-3' ; Amorce anti-sens site Xho1 (en gras)

##### b) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le protocole de PCR appliqué pour le clonage de la 15-PGDH reprend dans les grandes lignes celui décrits précédemment à la différence près ci-dessous :

La Taq Polymérase utilisée selon les données du fabricant (Pfu Turbo<sup>®</sup> DNA Polymerase), Stratagene cloning systems, 11011 North Torrey Pines Road , La Jolla, CA 92037.

Température d'hybridation 59°C, temps d'élongation 2 min, 25 cycles au total pour la 15-PGDH, amplimère attendu = 815 pb.

c) Les produits de PCR sont digérés par les enzymes de restrictions (BamH1 ; Xho1 pour la 15-PGDH) selon les données du fabricant (Amersham Pharmacia biotech, 12 avenue des Tropiques, ZA Courtaboeuf, 91944 Les Ulis) puis mis à migrer individuellement sur un gel d'agarose à 1,3 % (voir exemple 1 ; 6. Lecture)

d) Découpe des bandes correspondantes aux amplimères attendus (voir ac) à l'aide d'un scalpel (après repérage sous ultra-violets) et purification de ces découpes selon les recommandations du fabricant du kit Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification system (Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399).

e)

15-PGDH

Ligation dans un vecteur pGEX 4T3 (Amersham Pharmacia biotech, 12 avenue des Tropiques, ZA Courtaboeuf, 91944 Les Ulis) préalablement digéré (BamH1 / Xho1) et purifié, suivant les indications du fabricant du kit Fast-Link<sup>™</sup> DNA ligation kit, Epicentre, 1202 Ann Street, WI 53713.

f) Transformations.

Des bactéries compétentes de type BL21DE3plys seront utilisées pour la transformation avec la construction (pGEX4T3/15-PGDH). Cette souche est commercialisée par la société Stratagene. Les transformations sont réalisées selon un protocole classiquement appliqué tel que décrit par exemple dans le kit Fast-Link<sup>™</sup> DNA ligation précédemment utilisé. Les bactéries infectées (clones) sont sélectionnées (colonies blanches) après dépôt et culture 24h00 à 37°C d'une fraction

de ces produits de transformations sur LB-Agar medium coulée en boîte de pétri (L-2897, Sigma-Aldrich, L'isle D'Abeau Chesne, BP 701, 38297, Saint Quentin Fallavier) contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

g) Production de la 15-PGDH.

Une colonie provenant de la boîte de pétri « transformation 15-PGDH » est prélevée et introduite dans 250 ml de milieu LB (L-3022, Sigma-Aldrich, L'isle D'Abeau Chesne, BP 701, 38297, Saint Quentin Fallavier) contenant 100 µg/ml d'ampicilline, le flacon est incubé sous agitation 16h00 à 37°C.

Après 16h00, chacun des flacons est introduit dans un erlen contenant 2,5 L de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Ces deux erlens sont incubés sous agitation à 37°C pendant 3h00 à 4h00 (jusqu'à ce que la densité optique mesurée à 630 nm soit comprise entre 0,6-0,9).

Ajout d'isopropyl β-D thiogalactopyranoside (IPTG), (I6758, Sigma-Aldrich, L'isle D'Abeau Chesne, BP 701, 38297, Saint Quentin Fallavier) tel que la concentration finale titre 0,1 mM.

Les erlens sont incubés 24h00 supplémentaires sous agitation à température ambiante (20-25°C).

Les cultures ainsi obtenues sont centrifugées (par fraction de 250 ml) à 5000 trs/min pendant 7 minutes, les culots sont repris avec 3 ml de tampon phosphate 10 mM pH = 7,00 (4°C) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (protease inhibitor cocktail set I 539131, Calbiochem-Novabiochem Corporation, 10394 Pacific center Court, San Diego, CA 92121). Les suspensions bactériennes (regroupées en fractions de 40 ml dans un tube en polypropylène) sont bloquées dans la glace et soumis aux ultrasons (Vibra cell 20 kHz, 72434, Bioblock scientifique, Parc d'innovation, BP111, 67403 Illkirch) la sonde étant plongée dans chaque tube 15 secondes (6 chocs de 15 secondes par tube). Chaque tube est centrifugé à 4°C 16000 trs/minutes pendant 1h00 .

h) Purification de la 15-PGDH.

Les surnageants sont récupérés et introduits dans un tube polypropylène contenant 1 ml de Gluthatione-Sepharose<sup>®</sup> 4B (40 ml de surnageant pour 1 ml de Gluthatione-Sepharose<sup>®</sup> 4B) préalablement lavée selon les recommandations du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech, 12 avenue des Tropiques, ZA Courtaboeuf, 91944 Les Ulis).



Les tubes sont placés verticalement sur un agitateur rotatif, rotation 10 tours par minutes pendant 1h00 à la température de la pièce (20-25°C), les.

Les tubes sont centrifugés 1000 trs/min pendant 3 minutes, le surnageant est éliminé. Sont introduits dans chacun des tubes 40 ml d'un tampon phosphate 10 mM pH = 7,00. Après agitation douce (retournement) les tubes sont à nouveau centrifugés 3 minutes à 1000 trs/min.

L'opération est réalisée 5 fois. Un sixième lavage est réalisé avec 40 ml de tampon phosphate salin pH = 7,2 (PBS, Bio-Merieux S , 69280 Marcy-l'Etoile). Après centrifugation le surnageant est à nouveau éliminé.

#### i) Elution de la 15-PGDH

Une suspension de *thrombin Protease* est reconstituée à 1 unité/ $\mu$ l dans du PBS selon les recommandations du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech, 12 avenue des Tropiques, ZA Courtaboeuf, 91944 Les Ulis).

Sont introduits dans chaque tube contenant 1 ml de Gluthatione-Sepharose<sup>r</sup> 4B, 950  $\mu$ l de PBS et 50  $\mu$ l de suspension de thrombine reconstituée. Ceux-ci sont agités en position légèrement inclinée 16h00 à 250 trs/min. Après 16h00 les tubes sont centrifugés à 3000 trs/min pendant 5min, les surnageants sont recueillis.

Une évaluation de la quantité de protéine est effectuée en suivant la procédure de dosage Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr, Hercules, CA 94547).

Ainsi pour la 15-PGDH on obtient entre 0,2 et 5 mg de protéine par ml, 1 mg /ml le plus souvent.

Les suspensions protéiques ainsi obtenues sont diluées respectivement dans du PBS additionné de 10% de glycérol et du PBS telle que les concentrations protéiques finales titrent 0,2 mg /ml pour la 15-PGDH. La suspension est bloquée à -80°C jusqu'à utilisation.

Des analyses électrophorétiques (SDS-Page) réalisées dans des conditions standards démontrent la qualité des résultats ainsi obtenus.

**Exemple 4:** Evaluation de l'effet de molécules sur ces enzymes et caractérisation de certaine famille molécules comme inhibiteurs de la 15 PGDH.

#### a) Test 15-PGDH.

L'enzyme obtenue est à la concentration de 0,3 mg/ml et bloquée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cette suspension est décongelée et stockée dans la glace.

Préparation d'un tampon Tris 100 mM pH = 7,4 contenant 0,1 mM de dithiothreitol (D5545, Sigma-Aldrich, L'isle D'Abeau Chesne, BP 701, 38297, Saint Quentin Fallavier), 1,5 mM de  $\beta$ -NAD (N6522, Sigma-Aldrich, L'isle D'Abeau Chesne, BP 701, 38297, Saint Quentin Fallavier), 50  $\mu\text{M}$  de Prostaglandine  $\text{E}_2$  (P4172, Sigma-Aldrich, L'isle D'Abeau Chesne, BP 701, 38297, Saint Quentin Fallavier).

Dans la cuve d'un spectrophotomètre (Perkin-Elmer, Lambda 2) thermostaté à  $37^{\circ}\text{C}$  dont la longueur d'onde de mesure est réglée à 340 nm sont introduits 0,965 ml de ce tampon (préalablement porté à  $37^{\circ}\text{C}$ ). 0,035 ml de suspension enzymatique à  $37^{\circ}\text{C}$  sont introduits dans la cuve concomitamment à l'enregistrement (augmentation de la densité optique à 340 nm).

La vitesse maximale de réaction est relevée.

Les valeurs essais (molécules) sont comparées à la valeur témoin (sans molécule), les résultats sont exprimés en % de la valeur témoin.

Les résultats obtenus pour les molécules A et B sont les suivants:

à 50 $\mu\text{M}$	% Inhibition 15-PGDH
Molécule A	43
Molécule B	57

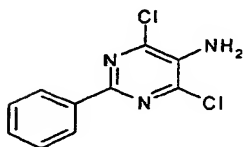
## REVENDEICATIONS

- 1- Utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase dans une composition ou pour la préparation d'une composition destinée à favoriser la pigmentation de la peau ou des phanères.
- 2- Utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase selon la revendication 1 caractérisée en ce que la composition est destinée à une administration par voie topique.
- 3- Utilisation d'au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est encapsulé dans une structure choisie parmi les microsphères, les nanosphères, les oléosomes et les nanocapsules.
- 4- Utilisation non thérapeutique d'une composition cosmétique contenant au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase pour le traitement de la canitie.
- 5- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que la composition contient en outre au moins un agent favorisant la pigmentation des cheveux et/ou des poils différent d'un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase.
- 6- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la composition contient en outre au moins un agent accélérateur de pénétration.
- 7- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la composition contient en outre au moins une prostaglandine ou un dérivé de prostaglandine.
- 8- Utilisation selon la revendication 7, caractérisé en ce que la composition contient en outre au moins un composé choisi parmi la prostaglandine PGE1, PGE2, leurs sels, leurs esters, leurs analogues et leurs dérivés, les agonistes du récepteur de la prostaglandine F2 alpha (FP-R) notamment le latanoprost, le fluprostenol, le cloprostenol, le travoprost, le bimatoprost, les agonistes des récepteurs de la prostaglandine E2 (EP1-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R) tel le 17 phényle PGE2, le

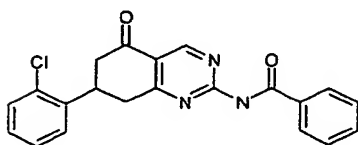
viprostol, le butaprost, le misoprostol, le sulprostone, le 16,16 diméthyle PGE2, 11 désoxy-PGE1, le 1 désoxy PGE1, les agonistes et leurs esters du récepteur de la prostacycline (IP) tel le cicaprost, l'iloprost, l'isopcarbacycline, le beraprost, les agonistes et leurs esters du récepteur de la prostaglandine D2 tel le BW245C ((4S)-(3-[(3R,S)-3-cyclohexyl-3-isopropyl]-2,5-dioxo)4-imidazolidineheptanoic acid), le ((4R)-(3-[(3R,S)-3-cyclohexyl-3-isopropyl]-2,5-dioxo)4-imidazolidineheptanoic acid), les agonistes du récepteur aux thromboxanes A2 (TP) tel le I-BOP ([1S-[1a,2a(Z), 3b(1E,3S),4a]]-7-[3-[3-hydroxy-4-[4-(iodophenoxy)-1-butenyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid, les précurseurs de ces composés, leurs esters et leurs dérivés.

- 9- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est choisi parmi le traxanox, ses sels et ses esters, le nafazatrom, les sulfasalazines, le PhCL28A, ou les thiazolidinediones.
- 10- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisée en ce que l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est peu ou pas inhibiteur de la prostaglandine synthase.
- 11- Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est choisi parmi les molécules suivantes:

Molécule A:



Molécule B:



- 12- Utilisation selon l'une des revendications 2 à 11, caractérisée en ce que la composition comprend un milieu cosmétologiquement acceptable constitué d'eau ou d'un mélange d'eau et d'au moins un solvant choisi parmi les solvants organiques hydrophiles, les solvants organiques lipophiles, les solvants organiques amphiphiles et leurs mélanges.
- 13- Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que l'inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase est présent dans la composition à une concentration comprise entre 0,001% et 5% p/v.
- 14- Procédé cosmétique pour favoriser la pigmentation de la peau, des poils et/ou des cheveux, caractérisé en ce que l'on applique sur la peau et/ou le cuir chevelu au moins un inhibiteur de 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase, ou une composition telle que définie dans l'une des revendications précédentes.
- 15- Composition susceptible d'être utilisée selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisée en ce qu'elle contient au moins un inhibiteur de la 15 hydroxy-prostaglandine déshydrogénase et un agent favorisant la pigmentation de la peau , des cheveux et/ou des poils.

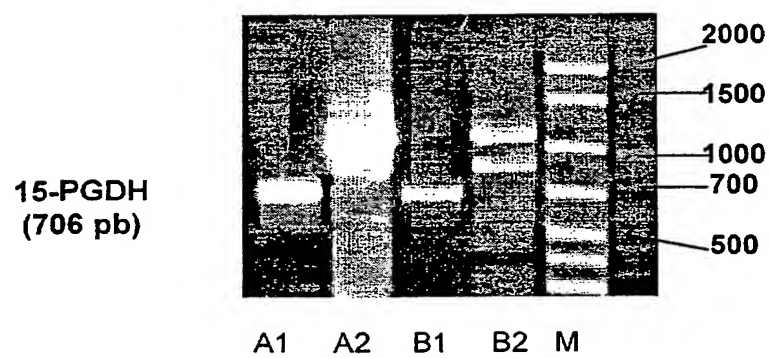


FIGURE 1

Best Available Copy

II

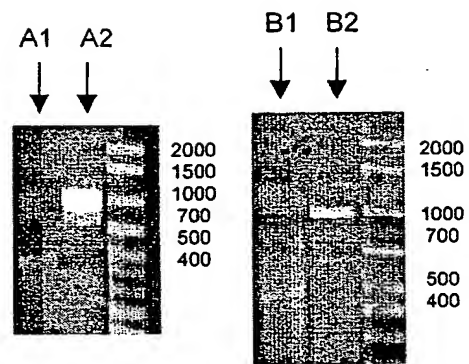


FIGURE 2

Best Available Copy



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 632773  
FR 0350023

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 5 514 374 A (BONTE ET AL.) 7 mai 1996 (1996-05-07) * revendications 1,26,27,30,31 * * colonne 1, ligne 5 - ligne 9 * * colonne 1, ligne 32 - ligne 37 * * colonne 4, ligne 1 - ligne 9 * * exemples 7,8 *	1,2,4-6, 10,12-15	A61K7/06 A61K7/02 A61K7/04
X	US 5 653 983 A (MEYBECK ET AL.) 5 août 1997 (1997-08-05) * revendications 16-22 * * colonne 1, ligne 9 - ligne 13 * * colonne 1, ligne 30 - ligne 41 * * colonne 1, ligne 57 - ligne 61 * * colonne 3, ligne 14 - ligne 21 * * exemples 5,6 *	1,2,4-6, 10,12-15	
X	US 5 965 157 A (LI ET AL.) 12 octobre 1999 (1999-10-12) * revendications 1,2,7 * * colonne 15, ligne 25 * * colonne 3, ligne 32 - ligne 33 * * colonne 5, ligne 6 - ligne 16 *	1-6,10, 12,14,15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
X	WO 99 51198 A (CODON PHARMACEUTICALS INC. ET AL.) 14 octobre 1999 (1999-10-14) * revendications 1,7 * * page 8, ligne 19 - ligne 23 * * page 1, ligne 11 *	1,2,5,6, 10,12, 14,15	
X	EP 1 145 705 A (L'OREAL) 17 octobre 2001 (2001-10-17) * revendications 1,10,21,23 * * alinéa '0031!; exemple 2 *	1-4,6, 12-15	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 octobre 2003		Alvarez Alvarez, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)





# RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 632773  
FR 0350023

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 96 25943 A (LIFE MEDICAL SCIENCES INC.) 29 août 1996 (1996-08-29)  * revendications 22,30,31,33 * * page 44, ligne 1 - ligne 9 *	1,2,4,6, 10,12, 14,15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	EP 0 884 045 A (PFIZER PRODUCTS INC.) 16 décembre 1998 (1998-12-16)  * revendications 17,18 * * page 14, ligne 30,36 * * page 15, ligne 36 - ligne 37 *	1,2,5,6, 9,10,12, 14,15	
A	WO 01 17479 A (ANDROSOLUTIONS INC.) 15 mars 2001 (2001-03-15) * page 14, ligne 22 - ligne 23 *		
A	US 6 103 765 A (NEAL) 15 août 2000 (2000-08-15) * colonne 4, ligne 58 - ligne 61 *		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
14 octobre 2003		Alvarez Alvarez, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0350023 FA 632773**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 14-10-2003  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5514374	A	07-05-1996	FR	2684300 A1	04-06-1993
			CA	2124555 A1	14-04-1994
			EP	0618801 A1	12-10-1994
			WO	9310804 A1	10-06-1993
			JP	7501336 T	09-02-1995
			US	5591437 A	07-01-1997
US 5653983	A	05-08-1997	FR	2679141 A1	22-01-1993
			DE	69211696 D1	25-07-1996
			DE	69211696 T2	28-11-1996
			EP	0595949 A1	11-05-1994
			ES	2090671 T3	16-10-1996
			WO	9301795 A1	04-02-1993
US 5965157	A	12-10-1999	US	5753263 A	19-05-1998
			US	5641508 A	24-06-1997
			US	6261596 B1	17-07-2001
			US	2003059464 A1	27-03-2003
			US	5914126 A	22-06-1999
			US	6224901 B1	01-05-2001
			AT	209887 T	15-12-2001
			AU	6554594 A	24-10-1994
			CA	2159626 A1	13-10-1994
			DE	69429337 D1	17-01-2002
			DE	69429337 T2	10-10-2002
			EP	0692972 A1	24-01-1996
			JP	2950520 B2	20-09-1999
			JP	8511510 T	03-12-1996
			WO	9422468 A1	13-10-1994
WO 9951198	A	14-10-1999	US	6267948 B1	31-07-2001
			AU	3472799 A	25-10-1999
			WO	9951198 A1	14-10-1999
EP 1145705	A	17-10-2001	FR	2807323 A1	12-10-2001
			CA	2343426 A1	10-10-2001
			EP	1145705 A2	17-10-2001
			JP	2001348323 A	18-12-2001
			US	2001044430 A1	22-11-2001
WO 9625943	A	29-08-1996	AU	4990496 A	11-09-1996
			CA	2213481 A1	29-08-1996
			EP	0812210 A1	17-12-1997
			JP	9010915 A	14-01-1997
			WO	9625943 A1	29-08-1996

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0350023 FA 632773**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 14-10-2003  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 884045 A	16-12-1998	AU 736351 B2	26-07-2001
		AU 6993398 A	10-12-1998
		CA 2239665 A1	06-12-1998
		EP 0884045 A1	16-12-1998
		JP 11012150 A	19-01-1999
		NZ 330613 A	28-01-1999
		US 6231837 B1	15-05-2001
		ZA 9804878 A	06-12-1999
WO 0117479 A	15-03-2001	AU 7360000 A	10-04-2001
		AU 7360700 A	10-04-2001
		EP 1214038 A2	19-06-2002
		EP 1214039 A2	19-06-2002
		WO 0117479 A2	15-03-2001
		WO 0117480 A2	15-03-2001
US 6103765 A	15-08-2000	AU 742787 B2	10-01-2002
		AU 8473498 A	08-02-1999
		EP 1005336 A1	07-06-2000
		JP 2001509480 T	24-07-2001
		NO 20000085 A	01-03-2000
		WO 9902147 A1	21-01-1999
		US 2002128314 A1	12-09-2002
		US 6414027 B1	02-07-2002
		US 6410595 B1	25-06-2002

EPO FORM P0485

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**